Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Online ISSN: 2345-427X
Print ISSN: 2345-4288

Study on liver lesions and mucosal indices of common carp (*Cyprinus carpio*) in exposure to different concentrations of nanoplastic

Alireza Mehri[1] | Seyed Aliakbar Hedayati[*2] | Ali Jafar Nodeh[3] | Safoura Abarghoui[4]

1. M.Sc. Student, Dept. of Fisheries and Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: alirezamehri1375@gmail.com
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Fisheries and Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: hedayati@gau.ac.ir
3. Ph.D. of Fisheries, Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: a.jafar55@gmail.com
4. Ph.D. Student, Dept. of Fisheries and Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: sabarghoei67@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 03.05.2021
Revised: 05.30.2021
Accepted: 06.06.2021

Keywords:
Contamination,
Histology,
Mucus,
Nanoplastic,
Serum

ABSTRACT

Skin mucus with strong mechanisms can trap and collect pathogens before contacting with the skin. The liver is a place of accumulation and purification of toxins and environmental pollutants and has different structural and functional complications in the face of pollutants. Fish mucus was collected from the epidermis of fish and the activity of alkaline phosphatase enzyme and the amount of soluble protein were measured. A part of liver tissue was prepared by classical histological method and stained by hematoxylin-eosin method. Then, the slides were prepared using imaging system attached to a microscope and tissue type was examined and the type and severity of lesions were examined. Experimental treatments had no significant effect on the amount of mucus alkaline phosphatase ($P>0.05$) but had a significant effect on the amount of mucus soluble protein ($P<0.05$). The amount of alkaline phosphatase and mucus soluble protein also increased with escalating concentration it was corrected. Experimental treatments also had a significant effect on serum ALT and AST ($P<0.05$) but had no significant effect on serum ALP ($P>0.05$), so that ALT and ALP due to treatments fed with the nanoplastic toxin also increased with enhancing concentration and the amount of AST also decreased. Nanoplastic toxin caused complications such as necrosis, watery swelling, cloudy swelling, fattening, macrophage accumulation, lateralization of the nucleus, bleeding, and thinning of the sinusoid in the liver. So that swelling had caused the most complication.

Cite this article: Mehri, Alireza, Hedayati, Seyed Aliakbar, Jafar Nodeh, Ali, Abarghoui, Safoura. 2022. Study on liver lesions and mucosal indices of common carp (*Cyprinus carpio*) in exposure to different concentrations of nanoplastic. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 10 (4), 15-26.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2021.18933.1581
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

بررسی عوارض کبدی و شاخص‌های موکوسی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوپلاستیک

علیرضا مهری[۱] | سید علی‌اکبر هدایتی*[۲] | علی جافر نوده[۳] | صفورا ابرقویی[٤]

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: alirezamehri1375@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: hedayati@gau.ac.ir

۳. دکتری شیلات، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: a.jafar55@gmail.com

٤. دانشجوی دکتری گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: sabarghoei67@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۵
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۰/۰۳/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۰۳/۱٦

واژه‌های کلیدی:
آلودگی،
بافت‌شناسی،
سرم،
موکوس،
نانو پلاستیک

چکیده

موکوس پوست با داشتن مکانیسم‌های قوی می‌تواند عوامل بیماری‌زا را قبل از تماس با پوست به دام انداخته و جمع‌آوری کند. کبد محل تجمع و تصفیه سموم و آلاینده‌های محیطی است و عوارض ساختاری و عملکردی متفاوتی در مواجهه با آلاینده‌ها دارد. موکوس ماهی کپور معمولی از سطح اپی‌درم جمع‌آوری شده و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و مقدار پروتئین محلول اندازه‌گیری شد. بخشی از بافت کبد تهیه و با روش بافت‌شناسی کلاسیک آماده و به روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی شد، سپس لام‌های تهیه شده با استفاده از سیستم عکسبرداری متصل به میکروسکوپ تصاویر بافتی تهیه شد و نوع و شدت آسیب‌ها مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهای آزمایشی بر مقدار آلکالین فسفاتاز موکوس تأثیر معناداری نداشت ولی بر مقدار پروتئین محلول موکوس تأثیر معناداری داشت، به‌طوری‌که مقدار پروتئین محلول موکوس در اثر تیمارهای تغذیه شده با سم نانوپلاستیک با افزایش غلظت نیز افزایش یافت. هم‌چنین تیمارهای آزمایشی بر مقدار ALT و AST سرم خون تأثیر معناداری داشت به‌طوری‌که مقدار ALT در اثر تیمارهای تغذیه شده با سم نانو پلاستیک با افزایش غلظت نیز افزایش یافت و مقدار AST نیز کاهش یافت. نانو پلاستیک باعث به‌وجود آمدن عارضه‌هایی مانند نکروز، تورم آبی، تورم ابری، چرب‌شدگی، تجمع ماکروفاژ، جانبی شدن هسته، خونریزش و رقیق شدن سینوزوئید در کبد شد. به طوری‌که تورم آبی بیش‌ترین عارضه را به وجود آورده است. در مطالعه حاضر نتایج به‌دست آمده از آسیب‌شناسی بافت کبد نشان می‌دهد که با افزایش غلظت نانوپلاستیک آسیب‌های وارد شده به بافت کبد با شدت بیش‌تری مشاهده گردید.

استناد: مهری، علیرضا، هدایتی، سید علی‌اکبر، جافر نوده، علی، ابرقویی، صفورا (۱۴۰۰). بررسی عوارض کبدی و شاخص‌های موکوسی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوپلاستیک. *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۰ (۴)، ۲۶-۱۵.

DOI: 10.22069/japu.2021.18933.1581

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

پلاستیک در سال ۱۹۴۰ تولید شد و میزان تولید و مصرف آن به سرعت در حال افزایش است به‌طوری‌که میزان تولید آن در مقیاس جهانی (سال ۲۰۰۹) به ۲۳۰ میلیون تن پلاستیک رسیده است (Thompson *et al*., 2009). تولید و مصرف پلاستیک‌ها در زندگی روزمره طی ۵۰ سال گذشته به‌دلیل خواص آن‌ها از جمله سبک، بادوام، و ارزان بودن، نسبت قدرت به وزن بالا، هدایت حرارتی کم، به‌طور پیوسته افزایش یافته است (Andrady, 2011). مطالعات نشان می‌دهند که حدود ۱۰٪ زباله‌های شهری در سراسر جهان به زباله‌های پلاستیکی اختصاص یافته است (Barnes *et al*., 2009). طی سال‌های اخیر میکروپلاستیک‌ها به‌عنوان نوع جدید از آلودگی محیطی مورد توجه جهانی قرار گرفتند. به‌گونه‌ای که از سال ۲۰۱۱ برنامه محیط زیست سازمان ملل متحد (UNEP) توجه ویژه‌ای را به بازمانده‌های پلاستیکی به‌خصوص میکروپلاستیک‌ها در اقیانوس‌ها داشته است. به‌علاوه این‌که ایالت آمریکا استفاده از ذرات پلاستیکی در مواد آرایشی و بهداشتی را از سال ۲۰۱۷ به بعد ممنوع کرده است (Kershaw *et al*., 2011). میکروپلاستیک‌ها در محیط زیست از دو منبع ایجاد می‌شوند: منبع اولیه و منبع ثانویه. میکروپلاستیک‌های اولیه پلاستیک‌هایی هستند که در ابعاد میکروسکوپی تولید می‌شوند و شامل پلت‌های پلاستیکی (گلوله‌های پلاستیکی)، الیاف، فیلم، دانه‌ها و پودرهای مورد استفاده در لوازم آرایشی (ضد آفتاب)، مواد صنعتی و محصولات تمیزکننده می‌باشند (Avio *et al*., 2015).

ماهی کپور معمولی یک گونه استنوهالین آب شیرین است و دمای اپتیمم برای رشد آن حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد است. کپور یکی از ماهیان ارزشمند و از نظر تغذیه‌ای بسیار پرمصرف می‌باشد و از معدود گونه‌هایی است که می‌توان آن را به‌عنوان ماهی اهلی به‌شمار آورد. علاوه بر این رشد مطلوب و مناسب، مقاومت در برابر بیماری‌ها و شرایط محیطی نامطلوب و دارا بودن نسبت مناسب حجم عضله یا گوشت نسبت به استخوان و احشاء از دیگر مزایای این ماهی می‌باشد. هم‌چنین این ماهی جزء ماهیان آنادرموس است که برای تخم‌ریزی و تکثیر وابسته به آب شیرین رودخانه‌ها می‌باشد (ستاری و همکاران، ۱۳۸۲).

پوست آبزیان به دلیل ترشح موکوس مانع از ورود باکتری‌ها می‌شود که یک مکانیسم دفاعی برای ماهیان می‌باشد و در فعالیت‌های ایمنی نقش دارند (Salinas *et al*., 2011). موکوس پوست با داشتن مکانیسم‌های قوی می‌تواند عوامل بیماری‌زا را قبل از تماس با پوست به دام انداخته و جمع‌آوری کند چراکه بیش‌تر باکتری‌ها و پاتوژن‌ها از غشاء نیمه تراوای پوست می‌توانند عبور کنند. به علاوه از جمله مکانیسم‌های دیگر موکوس پوست، محیطی را ایجاد می‌کند که ممکن است فعالیت ضد باکتریایی داشته باشد، در پوست ماهیان مکانی را برای فعالیت‌های مهم زیست‌شناختی مانند سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی ایجاد می‌کند و اعمال مختلفی مانند تنظیم یونی، تنظیم اسمزی، روان‌سازی و رفتار مراقبتی والدینی انجام می‌دهد. موکوس ماهیان عمدتاً از ترکیب آب و ماکرومولکول‌ها شامل موسین و دیگر پروتئین‌ها (گلیکوپروتئین‌ها، پروتئوگلیکان‌ها و پروتئین‌ها است، هم‌چنین حاوی نمک، چربی به‌عنوان مثال اسیدهای چرب)، فسفولیپیدها و کلسترول می‌باشد (Subramanian *et al*., 2007).

کبد ماهی‌های بزرگ سرشار از ویتامین‌های A و D است و تولید صفرا می‌کند. صفرا وارد روده می‌شود و برای هضم مواد چربی به‌کار می‌رود. این عضو چند وظیفه دارد که مهم‌ترین آن ساختن صفراست. کیسه صفرا کیسه‌ای است مخصوص

ساختن صفرای زرد رنگ و ذخیره آن، کبد ماهی‌ها ممکن است مانند آزاد ماهی‌ها یک قطعه‌ای یا مثل کپور ماهی‌ها چند قطعه‌ای باشد. کبد ماهی‌ها عمل ذخیره گلیکوژن، ساختن روغن ماهی که سرشار از ویتامین A و D است، ساختن صفرا و نیز سنتز روغن گلیکوژن را به عهده دارد. مقدار گلیکوژن در ماهی‌های آب‌های شیرین بیش‌تر از ماهی‌های آب‌های شور است (نوریموگهی‌و همکاران، ۱۳۹۰).

با افزایش کشاورزی و صنعتی شدن آن و استفاده زیاد از سموم باعث افزایش آلاینده‌هایی هم‌چون سم نانو پلاستیک در آب و هم‌چنین نامساعد شدن کیفیت آب شده است که این آلاینده‌ها سبب ایجاد پاسخ تنش در ماهیان می‌شود که بر وضعیت فیزیولوژیک و سلامت ماهیان اثرگذار بوده و عملکرد ایمنی ماهیان را کاهش می‌دهند. این پژوهش با هدف بررسی پاسخ‌های خون‌شناسی، بیوشیمیایی و موکوسی ماهی کپور معمولی در مواجه با نانو پلاستیک است.

مواد و روش‌ها

ذرات نانو پلی‌استایرن به صورت امولسیون در محدوده ۷۰ نانومتری تهیه شد (شکل ۱). استایرن به‌عنوان مونومر، پلی‌وینیل‌الکل (PVA) با جرم مولکولی ۱۲۸۰۰۰ گرم بر مول به عنوان تثبیت‌کننده از شرکت مرک آلمان و بنزوئیل‌پراکسید به عنوان آغازگر از شرکت آلفا آریزر (آمریکا) خریداری شدند. استایرن قبل از استفاده تقطیر شد و سایر مواد شیمیایی به‌همان صورت مورد استفاده قرار گرفت. هم‌چنین در تمام آزمایش‌ها آب دیونیزه به‌کار برده شد (تهامی وکیلی و همکاران، ۲۰۱٦؛ شوهانی و همکاران، ۲۰۱۷). ذرات پلی‌استایرن مطابق با پژوهش‌های تهامی و همکاران و شوهانی و همکاران ساخته شد، بر طبق این روش‌ها، ۳-۱ درصد وزنی آغازگر (بنزوئیل پراکسید)، ٤-۱ درصد وزنی تثبیت‌کننده (پلی‌وینیل الکل) انتخاب و سرعت هم‌زدن ۷۵۰-۵۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پلیمریزاسیون در یک راکتور یک لیتری سه‌دهانه، مجهز به قیف اضافه‌کننده (اضافه کردن قطره‌ای مونومر استایرن)، خنک‌کننده و دماسنج انجام شد. در ظرف واکنش ٤۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، آغازگر و تثبیت‌کننده اضافه شد و گاز نیتروژن به‌مدت ۲۰ دقیقه برای خارج کردن اکسیژن محلول از آن عبور داده شد. سپس دما را به ۹۰ درجه سانتی‌گراد رسانده و ضمن هم‌زدن به تدریج طی مدت نیم ساعت استایرن قطره قطره اضافه شد و واکنش پلیمریزاسیون به‌مدت ۸ ساعت ادامه یافت (تهامی وکیلی و همکاران، ۲۰۱٦؛ شوهانی و همکاران، ۲۰۱۷).

این پژوهش در سالن آبزی‌پروری ونیرو شهید فضلی برآبادی دانشکده شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. مجموعاً ۸٤ عدد ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی ۳۰ گرم تهیه و در مخازنی با هوادهی و جریان مناسب آب به‌مدت دو هفته نگهداری و روزانه تغذیه شدند تا با شرایط جدید سازگاری یابند. سپس ماهیان به‌صورت تصادفی تیماربندی شدند. گروه‌های آزمایش شامل: گروه شاهد با غذای پایه و فاقد نانوپلاستیک پلی‌استایرن و تیمارها با غذای حاوی ۰/۱، ۰/۵ و ۱ سی‌سی نانوپلی‌استایرن قرار گرفتند. نانوپلاستک سنتز شده امولسیونی، بر روی غذا اسپری شد و از ژلاتین ۲ درصد برای تثبیت نانومواد بر روی غذا استفاده شد سپس غذای تهیه شده به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای محیط خشک شده و سپس در ظروف استریل نگهداری شد.

آزمایش‌های سمیت تحت‌حاد در مدت زمان ۲۸ روز انجام شد. جهت اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون شامل آنزیم‌های کبدی آلانین ترانسامیناز (ALT)، میزان آسپارتات ترانسامیناز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) از کیت‌های تجاری پارس آزمون استفاده شد.

جمع‌آوری موکوس پوست: موکوس ماهی‌ها بر اساس روش (Subramanian *et al.*, 2007) از سطح اپی‌درم ماهی جمع‌آوری شد (۲٤ ساعت قبل از نمونه‌برداری غذادهی قطع گردید). ابتدا ۳ قطعه بچه‌ماهی به‌طور تصادفی از هر تانک نمونه‌برداری شده و پس از بیهوش کردن با پودر گل میخک (۵ میلی‌گرم در لیتر) برای جمع‌آوری موکوس ماهی‌ها به‌صورت جداگانه درون کیسه‌های پلی‌اتیلنی (زیپ پلاست) حاوی ۱۰ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۵۰ میلی‌مولار قرار گرفته شد، سپس نمونه‌ها به مدت ۱-۲ دقیقه به آرامی تکان داده شد تا باعث تحریک ترشح موکوس در اپی‌درم ماهی شود. پس از آن بچه‌ماهیان از کیسه خارج و به مخزن آب پر از اکسیژن منتقل شدند. موکوس جمع‌آوری شده را درون لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتر ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰×g و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند (digital 5810, R eppendrof centrifuge) و سوپرناتانت حاصل (موکوس) به میکروتیوپ‌های ۱/۵ml ریخته و علامت‌گذاری شدند. نمونه‌ها جهت بررسی‌های بیش‌تر تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

سنجش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: برای تعیین میزان فعالیت این آنزیم از کیت مخصوص سنجش فعالیت آنزیم آلکاین فسفاتاز (شرکت پارس آزمون) و به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ٤۰۵ نانومتر و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد (Rabitto *et al.*, 2005).

سنجش مقدار پروتئین محلول: برای اندازه‌گیری توتال پروتئین (شرکت پارس آزمون) از معرف رنگی فولین فنول سیوکالتیو[1] استفاده شد. در این روش ابتدا پروتئین با یون Cu^{2+} موجود در محلول قلیایی واکنش می‌دهد. در ادامه با اضافه کردن معرف فولین، آنیون‌های فسفو مولیبدات و فسفو تنگستات موجود در معرف با تریپتوفان و تیروزین موجود در پروتئین واکنش داده و عمل احیا صورت می‌گیرد. به نظر می‌رسد یون مس در این واکنش نقش کاتالیزوری دارد (Zhou *et al.*, 2009).

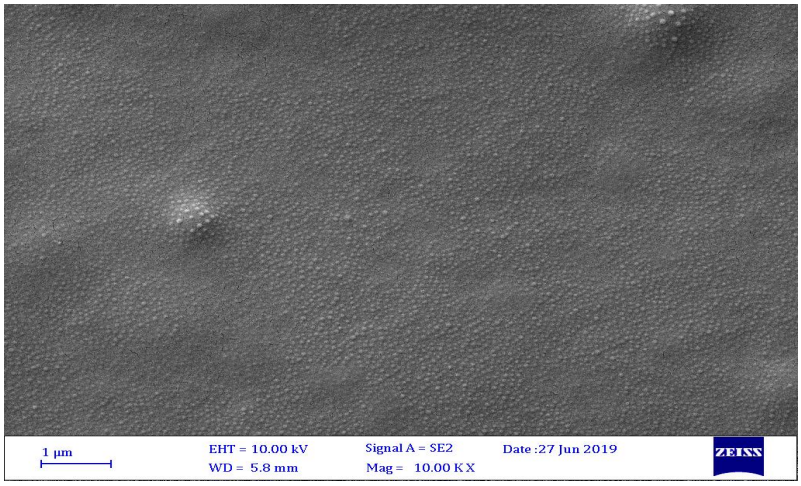
بررسی آسیب‌های بافتی: با استفاده از تیغ جراحی، شکم ماهی از ناحیه جلوی باله شکمی تا باله مخرجی، به طور کامل باز و پس از نمایان شدن کبد و روده از آن نیز نمونه‌برداری گردید. .بخشی از بافت‌های کبد و روده جهت انجام مطالعات بافتشناسی در ظروف حاوی فرمالین ۱۰٪ نگهداری شد. به‌منظور نگهداری مناسب بافت، حجم فرمالین استفاده شده در این ظروف حدود ۵ برابر بافت موجود در ظرف بود و پس از ۲٤ ساعت فرمالین موجود در ظرف حاوی بافت‌ها، با فرمالین تازه جایگزین شد و بافت‌ها تا زمان ادامه مراحل بافت‌شناسی در همین محلول‌ها نگهداری و به آزمایشگاه بافت شناسی منتقل شدند. برای آماده‌سازی بافتی از دستگاه اتوتکنیکون (DID SABZ2080/H, Iran) استفاده شد. برشگیری با استفاده از دستگاه میکروتوم (Leitez Germany, 1512) صورت گرفت و برش‌هایی به اندازه ۵ میکرومتر از بافت تهیه گردید سپس آب‌گیری، شفاف‌سازی و بعد قالب‌گیری شد و به روش هماتوکسیلین- ائوزین Haematoxylin & Eosin (H&E) رنگ‌آمیزی شدند (Bancroft *et al.*, 2008). سپس لام‌های تهیه شده برای بررسی آسیب‌شناسی توسط میکروسکوپ نوری (Olympus CX21, Japan) مورد ارزیابی قرار گرفتند و با استفاده از سیستم عکسبرداری متصل به میکروسکوپ مدل Tucsen TrueChrome Metrics

1- Folin-Ciocalteu's phenol reagent

تصاویر بافتی تهیه شد و نوع و شدت آسیب‌ها مورد بررسی قرار گرفت. شدت آسیب‌ها بر اساس عدم وجود، خفیف، متوسط و شدید با علائم –، +، ++، +++ درجه‌بندی شدند (Thophon *et al.*, 2003).

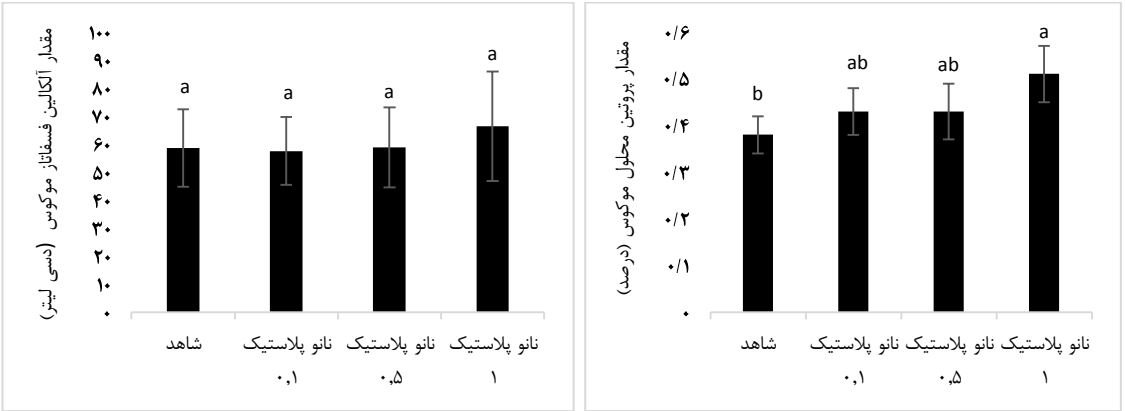
نتایج

تصاویر FE-SEM نشان داد ذرات امولسیونی سنتز شده در محدوده ۷۰ نانومتر هستند (ZEISS آلمان مدل SIGMA VP).



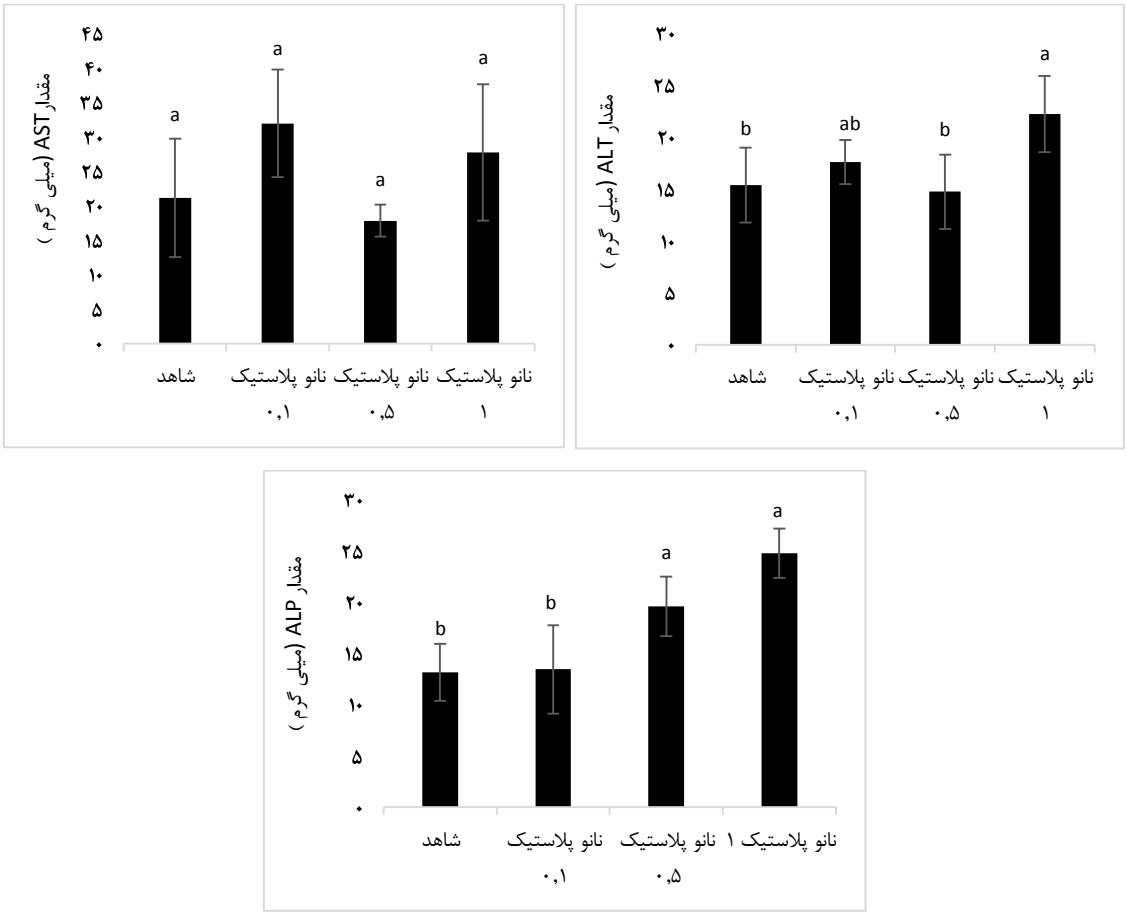
شکل ۱- سنتز ذرات کوانتوم دات در محدوده ۷۰ نانومتری.

بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع، تیمارهای آزمایشی بر مقدار آلکالین فسفاتاز موکوس تأثیر معناداری نداشت (P>۰/۰۵) ولی بر مقدار پروتین محلول موکوس تأثیر معناداری داشت (P<۰/۰۵) به‌طوری‌که مقدار آلکالین فسفاتاز و پروتئین محلول موکوس در اثر تیمارهای تغذیه شده با سم نانوپلاستیک با افزایش غلظت نیز افزایش یافت. (شکل ۲).



شکل ۲- پارامترهای موکوس ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانو پلاستیک در تیمارهای مختلف آزمایشی.
حروف انگلیسی یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح (P>۰/۰۵) بین تیمارهای آزمایشی است
و حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) بین تیمارهای آزمایشی است.

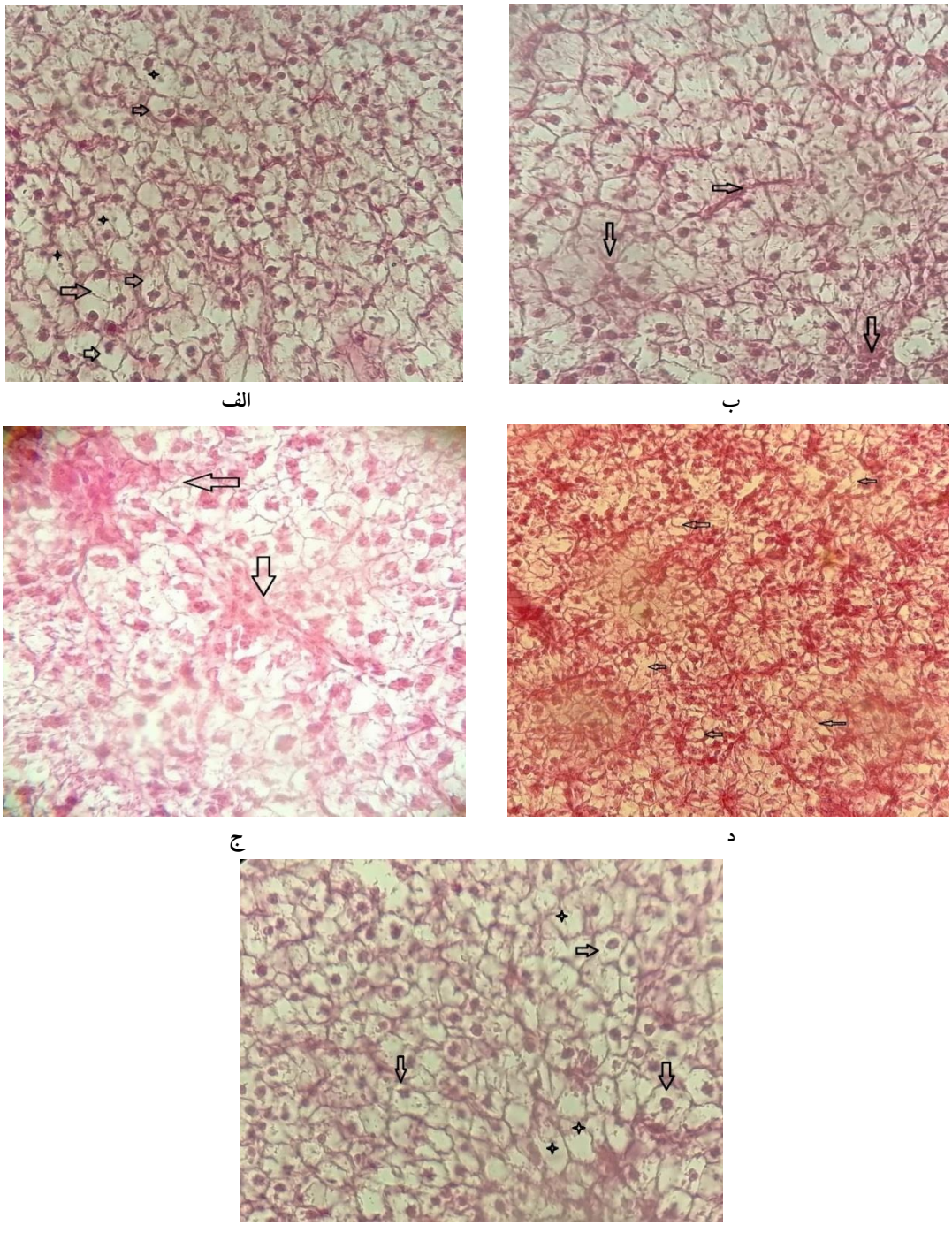
بررسی تجریه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع، تیمار ای آزمایشی بر مقدار ALT و AST سرم خون تأثیر معناداری داشت (P<۰/۰۵) ولی بر مقدار ALP سرم خون تأثیر معناداری نداشت (P>۰/۰۵) به‌طوری‌که مقدار ALT و ALP در اثر تیمارهای تغذیه شده با سم نانوپلاستیک با افزایش غلظت نیز افزایش یافت و مقدار AST نیز کاهش یافت (شکل ۳).



شکل ۳- شاخص‌های آنزیمی سرم خون ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوپلاستیک در تیمارهای مختلف آزمایشی.
حروف انگلیسی یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح (P>۰/۰۵) بین تیمارهای آزمایشی است
و حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) بین تیمارهای آزمایشی است.

طبق بررسی‌های انجام شده سم نانوپلاستیک باعث به وجود آمدن عارضه‌هایی مانند نکروز، تورم آبی، تورم ابری، چرب‌شدگی، تجمع ماکروفاژ، جانبی شدن هسته، خونریزش و رقیق شدن سینوزوئید در کبد می‌شود (شکل ۳). به‌طوری‌که تورم آبی بیش‌ترین عارضه را به وجود آورده است. عارضه نکروز در تیمارهای ۱، ۲، ۳ با اثر تخریبی زیادی بروز پیدا کرد ولی در گروه شاهد بروز پیدا نکرد. عارضه تورم آبی در گروه شاهد و تیمار ۱ با اثر تخریبی کم و در تیمار ۲ با اثر تخریبی زیاد و در تیمار ۳ با اثر تخریبی خیلی زیادی بروز پیدا کرد. عارضه تورم ابری در گروه شاهد بروز پیدا نکرد و در تیمار ۱ اثر تخریبی کم و در تیمار ۲ با اثر تخریبی زیاد و در تیمار ۳ با اثر تخریبی خیلی زیادی بروز پیدا کرد. عارضه جانبی

شدن هسته فقط در تیمار ۳ با اثر تخریبی کمی بروز کرد. عارضه خونریزش در گروه شاهد بروز پیدا نکرد، در تیمار ۱ اثر تخریبی کم و در تیمارهای ۲، ۳ با اثر تخریبی زیادی بروز پیدا کردند. عارضه‌های چرب‌شدگی، تجمع ماکروفاژ و رقیق شدن سینوزوئید هیچ اثری نداشتند (جدول ۱).



الف ب ج د ه

شکل ٤- اثرات آسیب‌شناختی کبد ماهی کپور معمولی در غلظت‌های متفاوت سم نانوپلاستیک، رنگ‌آمیزی E&H، بزرگنمایی 40X. عارضه‌ها الف) تورم آبی فلش، تورم ابری ستاره. ب) جانبی شدن هسته. ج) خونریزش. د) نکروز. ه)تورم آبی فلش، تورم ابری ستاره.

جدول ۱- شدت آسیب‌های بافتی مشاهده شده در بافت کبد ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف سم نانوپلاستیک.

عارضه	۱	۲	۳	٤
نکروز (necrosis)	-	++	++	++
تورم آبی (*Hydropic swelling*)	+	+	++	+++
تورم ابری (*Cloudy swelling*)	-	+	++	+++
چرب‌شدگی (*Lipidosis*)	-	-	-	-
تجمع ماکروفاژ (*Macrophage aggregates*)	-	-	-	-
جانبی شدن هسته (*Lateral nuclei*)	-	-	-	+
خونریزش (*Hemorrhage*)	-	+	++	++
رقیق شدن سینوزوئید (*Dilation of sinusoid*)	-	-	-	-

بحث و نتیجه‌گیری

آلودگی اکوسیستم‌های آبی، با تغییرات آسیب‌شناسی در ماهیان همراه بوده به‌طوری‌که وقتی ماهیان در معرض آلودگی قرار می‌گیرند، می‌توان از طریق بررسی هیستولوژیکی میزان آلودگی محیط آبی را تعیین نمود و این یک روش استاندارد برای تشخیص تغییرات آسیب‌شناختی در ماهیان آب شیرین میباشد (Roncarati *et al.*, 2006). افزایش تولید محصولات نانوپلاستیک منجر به ورود بی‌رویه نانوذرات به محیط زیست می شود و در صورتی که میزان زیادی از نانوذرات در بدن موجودات زنده تجمع یابند، می‌توانند آسیب‌ها و مسمومیت‌هایی را به دنبال داشته باشند (Blaise *et al.*, 2008). بافت کبد به علت عملکرد، موقعیت و جریان خونی که دریافت می‌کند، هم‌چنین نقش مهمی که در سوخت‌وساز، پالایش و انتقال زیستی مواد در بدن دارد، تأثیر قابل‌توجهی از آلاینده‌های موجود در آب می‌پذیرد (Naeemi *et al.*, 2013). کبد نسبت به انواع سموم حساس می‌باشد و یکی از وظایف مهم آن تمیزکردن مواد آلاینده از خون است (Chavan *et al.*, 2014). مطالعات اخیر ارتباط بین در معرض بودن آلاینده‌ها و آسیب‌های کبدی را ثابت کرده است. آسیب‌های کبدی ایجاد شده در گونه‌های مختلف ماهی در اثر سموم، به‌عنوان شاخص‌های بیولوژیکی مؤثری محسوب میشوند (Stehr *et al.*, 2004). آنزیم‌های کبدی به عنوان شاخص فعالیت کبدی محسوب می‌شوند و تغییر در میزان فعالیت و ترشح آن ها می توانند متاثر از فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب، تراکم، شرایط پرورشی، نوع جیره مصرفی، سن، جنس و وضعیت سلامت ماهیان باشد (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲).

نتایج این پژوهش نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی مقدار ALT و AST سرم خون ماهی تأثیر معناداری داشت ($P<0/05$) ولی بر مقدار ALP سرم خون ماهی تأثیر معناداری نداشت ($P>0/05$). از آن‌جایی‌که کبد اندامی است متابولیسم اولیه مواد غیرزیستی انجام می‌دهد و با تغییر در ساختار مورفولوژیک این مواد، در برخی موارد، سم‌زدایی می‌نماید، تأثیر آلایندگی نانوذرات به‌صورت افزایش یا کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی و ایجاد تغییرات هیستو پاتولوژیک کبدی بروز می‌کند. به‌همین دلیل در ارزیابی آسیب کبد، سنجش سطوح آنزیم‌هایی مانند ALT، AST و ALP به طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرد. وقوع نکروز یا آسیب غشا سلول باعث رها شدن این آنزیم‌ها به گردش خون

می‌شود (Park *et al.*, 2010). ALT به طور عمده در کبد وجود دارد و برای کبد اختصاصی‌تر از AST است. در جریان آسیب حاد، آنزیم‌های ALT و AST حساس‌ترین مارکرهای سرمی هستند. هرگاه غشا سلول صدمه ببیند هر دو آنزیم به مقادیر فزاینده‌ای در خون آزاد می‌شوند (رادگهر، ۱۳۹۰). AST و ALT جز سرمی آنزیم‌های غیر عملکردی پلاسما هستند که به‌طور طبیعی در سلول‌های برخی از اندام‌ها از جمله کبد قرار گرفته‌اند. یکی از دلایل افزایش سطح سرمی این آنزیم‌ها ممکن است تغییر در نفوذپذیری غشای پلاسمایی سلول‌ها کبدی یا صدمات سلولی حاصل از قرار گرفتن در معرض نانو ذرات باشد. بنابراین، پایش نشت آنزیم‌های کبدی به داخل خون، ابزار بسیار مفیدی در مطالعات آسیب کبدی با نانوذرات می‌باشد (Park *et al.*, 2010).

آمینوترانسفرازها معرفی برای سلامت سلول‌های کبدی شمار می‌روند و در مراحل اولیه تخریب کبد، آنزیم‌های سیتوپلاسمی هپاتوسیت‌ها احتمالاً از سلول‌ها به داخل جریان خون نشت می‌کنند و نفوذپذیری غشا افزایش می‌یابد. احتمالاً در اثر از دست دادن سلول‌های کبدی، این آنزیم‌ها در خون آزاد می‌شوند. بنابراین افزایش این آنزیم‌ها نشان‌هایی از آسیب سلول‌های کبدی است (Crain-Christ *et al.*, 2004). در واقع کبد محلی برای واکنش‌های چندگانه اکسایشی و تولید حداکثر رادیکال آزاد در بدن محسوب می‌شود. رادیکال‌های آزاد تولید شده در طی فرآیند متابولیسم مواد شیمیایی موجب تخریب غشا سلول‌ها و بروز اختلال در فعالیت کانال‌های تنظیم یونی در سطح آن‌ها می‌گردد.

بروز اشکال در فرایند تنظیم یونی، به ویژه یون کلسیم موجب مهار فسفورالسیون اکسایشی درون سلولی می‌شود و این پدیده منجر به بر هم خوردن توان تنظیم اسمزی غشاهای زیستی و سلولی، افزایش حجم هسته و هستک‌ها و در نهایت مرگ سلولی می‌شود و به‌صورت تغییرات آسیب‌شناسی بافتی نمود می‌یابد (Isik *et al.*, 2008). آنزیم آالانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز که در ماهیان وجود دارند، عضوی از خانواده ترانس آمینازها هستند. این آنزیم‌ها در بافت کبد تغلیظ می‌شوند. مقادیر این آنزیم‌ها در بیماری‌های حاد کبد در اثر تماس با سموم کبدی افزایش می‌یابد. در بیماری‌های حاد کبدی که منجر به ایجاد صدمات غشایی یا نکروز سلولی می‌شوند، فعالیت آالانین آمینوترانسفراز در سرم خون به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌یابد (Mojabi *et al.*, 2000).

طبق بررسی‌های انجام شده سم نانوپلاستیک باعث به وجود آمدن عارضه‌هایی مانند نکروز، تورم آبی، تورم ابری، چرب‌شدگی، تجمع ماکروفاژ، جانبی شدن هسته، خونریزش و رقیق شدن سینوزوئید در کبد می‌شود. به‌طوری‌که تورم آبی بیش‌ترین عارضه را به وجود آورده است. درمطالعه حاضر نتایج به‌دست آمده از آسیب‌شناسی بافت کبد نشان می‌دهد که با افزایش غلظت نانوپلاستیک آسیب‌های وارد شده به بافت کبد با شدت بیش‌تری مشاهده گردید. نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر این است که ورود مقادیر بالایی از نانوپلاستیک به محیط‌های آبی می‌تواند سبب بروزآثار زیانباری روی سلامت ماهی‌ها گردد، بنابراین پیش‌بینی تمهیداتی برای کاهش و جلوگیری از ورود این نانوذرات به محیط زیست آبزیان و در صنایع مختلف دریایی و آبزی‌پروری امری مهم و ضروری به‌نظر می‌رسد. پیشنهاد می‌گردد میزان انواع نانوپلاستیک‌ها و منابع ورود آن‌ها به محیط زیست آبزیان و هم‌چنین اثرات آن‌ها در بافت‌های مختلف و ویژگی‌های خونی و بیوشیمیایی آبزیان مورد پایش مستمر قرار گیرد.

منابع

Abarghouei, S., Hedayati, A., Raeisi, M., Hadavand, B.S., Rezaei, H., and Abed-Elmdoust, A. 2021. Size-dependent effects of microplastic on uptake, immune system, related gene expression and histopathology of goldfish (*Carassius auratus*). Chemosphere, 129977.

Andrady, A.L. 2011. Microplastics in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, 62(8): 1596-1605.

Avio, C.G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., … and Regoli, F. 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution*, 198: 211-222.

Bancroft, J.D., and Gamble, M. 2008. Theory and practice of histological techniques. Elsevier Health Sciences. pp. 126-127.

Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C., and Barlaz, M. 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526): 1985-1998.

Besseling, E., Wang, B., Lürling, M., and Koelmans, A.A. 2014. Nanoplastics affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. Environ. Sci. Technol. 48 (20): 12336e12343.

Blaise, C., Gagné, F., Ferard, J.F., and Eullaffroy, P. 2008. Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. Environ toxicol. 23(5): 591-598.

Chavan, V.R., and Muley, D.V. 2014. Effect of heavy metals on liver and gill of fish *Cirrhinus mrigala*. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 3(5): 277 -288.

Christ-Crain, M., Meier Cpuder, J., Staub, J., Huber, P., and Keller, U. 2004. Changes in liver function correlate with the improvement of lipid profile after restoration of euthyroidism inpatients with subclinical hypothyroidism. Experimental and Clinical Sciences: International Online Journal for Advances in Science, 3: 1-9. DOI: 10.17877/DE290R-14916.

Isik, I., and Celik, I. 2008. Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Pesticide Biochemistry and Physiology. 92(1): 38-42.

Kershaw, P., Katsuhiko, S., Lee, S., and Woodring, D. 2011. Plastic debris in the ocean: United Nations Environment Programme.

Mojabi, A., Nazifi, S., and Safi, Sh. 2000. Veterinary clinical biochemistry. Noorbakhsh publication. 512p. (In Persian)

Naeemi, A., Jamili, S., Shabanipour, N., Mashinchian, A., and Shariati Feizabadi, S. 2013. Histopathological changes of gill, liver and kidney in Caspian kutum exposed to linear alkylbenzene sulfonate. Iran J. Fish. Sci . 12(4): 887-897.

Park, E.J., Bae, E., Yi, J., Kim, Y., Choi, K. and Lee, S.H. 2010. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. Environmental Toxicology and Pharmacology, 30(2): 162-168. DOI: 10.1016/j.etap.2010.05.004.

Rabitto, I.S., Alves Costa, J.R.M., Silva de Assis, H.C., Pelletier, E., Akaishi, F.M., Anjos, A., and Oliveira Ribeiro, C.A. 2005. Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, Hoplias malabaricus: histopathological and biochemical findings. Ecotoxicology and environmental safety, 60(2): 147-156.

Roncarati, A., Melotti, P., Dees, A., Mordenti, O., and Angellotti, L. 2006. Welfare status of cultured seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) and seabream (*Sparus aurata* L.) assessed by blood parameters and tissue characteristics. International Aquatic Research. 22(3): 225-234.

Salinas, I., Zhang, Y.A., and Sunyer, J.O. 2011. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. Developmental & Comparative Immunology. 35:1346-1365.

Shohani, N., Pourmahdian, S., and Shirkavand Hadavand, B., 2017. Response surfacemethodology for design of porous hollow sphere thermal insulator. MS&E. 269 (1): 012073.

Stehr, C.M., Myers, M.S., Johnson, L.L., Spencer, S., and Stein, J.E. 2004. Toxicopathic liver lesions in English sole and chemical contaminant exposure in Vancouver Harbour, Canada´. Mar, Environment, Res. 57: 55-74.

Subramanian, S., MacKinnon, S.L., and Ross, N.W. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 148(3): 256-263.

Subramanian, S., MacKinnon, S.L., and Ross, N.W. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 148(3): 256-263.

Tahami, S.V., Pourmahdian, S., Hadavand, B.S., Azizi, Z.S., and Tehranchi, M.M., 2016. Thermal tuning the reversible optical band gap of self-assembled polystyrene photonic crystals. Photon. Nanostruct. Fund. Appl. 22: 40e45.

Thompson, R.C., Moore, C.J., Vom Saal, F.S., and Swan, S.H. 2009. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526): 2153-2166.

Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E. S., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S., and Jaritkhuan, S. 2003. Histopathological alterations of white seabass, Lates calcarifer, in acute and subchronic cadmium exposure. Environ. Pollut. 121(3): 307-320.

Zhou, W., Wang, G., Han, Z., Yao, W., and Zhu, W. 2009. Metabolism of flaxseed lignans in the rumen and its impact on ruminal metabolism and flora. Animal Feed Science and Technology, 150: 18-26.